Aus der Universitätskinderklinik Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Ergothioneingehalt der Erythrozyten in verschiedenen Altersstufen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christiane Fues, geb. Lachmund
aus Hannover

Marburg 1972

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546018_0059

Aus der Universitätskinderklinik Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Ergothioneingehalt der Erythrozyten in verschiedenen Altersstufen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christiane Fues, geb. Lachmund
aus Hannover

Marburg 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Philipps - Universität Marburg a.d. Lahn am 23.1 1973

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan:	Prof.Dr.H. Oepen
Referent:	Prof.Dr.W. Barthelmai
Correferent:	Prof.Dr.K. Müller

INHALT

1. Einleitung
2. Biochemische Funktionen der sulfhydrilgruppenhaltigen Substanzen in den Erythrozyten
3. Bisher entwickelte Bestimmungsverfahren des Ergothioneins in Erythrozyten
4. Eigene Fragestellung
5. Probanden und Untersuchungsmaterial
6. Methodik
   a) Reagentien und Lösungen
   b) Apparate
   c) Ergothioneinbestimmung nach HUNTER
   d) GSH-Bestimmung nach BEUTLER
   e) GSSG-Bestimmung nach RACKER
   f) Chloroformausschüttelung
   g) Vorbereitung der CM 23-Cellulose
   h) Anwendung der Ionenaustauschercellulose
   i) Blutfiltrierung durch Baumwolle (BUSCH)
   j) Retikulozytenanreicherung (WITT)
   k) Statistische Sicherung der Versuchsergebnisse
7. Eigene methodische Versuche und deren Ergebnisse
   a) Färbung der wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen mit DTNB
   b) HUNTERsche Diazomethode, ihre Modifikationen (MELVILLE) und eigene Variationen
   c) Endgültiges eigenes Vorgehen
8. Ergebnisse der Ergothionein- und Glutathionbestimmungen
   a) Der Ergothioneingehalt in Erythrozyten verschiedener Altersstufen
   b) Der Glutathiongehalt in Erythrozyten verschiedener Altersstufen
   c) Der Anteil des Ergothioneins an der Gesamtheit der sulfhydrilgruppenhaltigen Substanzen

d) Der Ergothioneingehalt in retikulozytenreichen und retikulozytenarmen Erythrozytenpopulationen
e) Das Verhalten des Ergothioneinspiegels in alterndem Blut
9. Diskussion
10. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Anhang: Ergebnisse, tabellarisch zusammengefaßt

1. EINLEITUNG

Ergothionein, unter anderem ein Bestandteil der roten Blutkörperchen, gehört wie Glutathion und Cystein zu den Substanzen, die wasserlösliche Sulfhydrilgruppen enthalten. Diese SH-Gruppen gewähren der Erythrozytenmembran wie auch dem Hämoglobin und den Enzymen mit sulfhydrilhaltigen Wirkzentren Schutz vor oxidativer Schädigung. Dadurch können Zellmembran, Farbstoff und Enzyme ihre Aufgaben erfüllen. Die größte Bedeutung kommt hierbei wahrscheinlich dem Glutathion zu, mit dem sich bisher viele Arbeiten befassten. Über Ergothionein ist dagegen bis heute sehr wenig bekannt.

Diese Substanz wurde 1909 von TANRET im Mutterkorn gefunden und isoliert. Er erstellte auch die empirische Formel. Danach ist Ergothionein das Betainderivat des Thiolhistidins, einer Aminosäure. Es ist gut wasserlöslich, sein Molekulargewicht beträgt 256,33.
1925 beschrieben HUNTER und EAGLES einen Stoff, der die Harnsäurebestimmung im Blut störend beeinflußte. Sie nannten ihn Sympektothion. BENEDICT und BEHRE fanden 1926 eine ähnliche Substanz, der sie den Namen Thiasin gaben. 1927 wiesen sowohl NEWTON et al. als auch EAGLES und JOHNSON die Identität der drei Substanzen Ergothionein, Sympektothion und Thiasin nach.
Erst 1926 gelang ASKARI und MELVILLE die Aufdeckung der Biosynthese von Ergothionein. Sie untersuchten sie in Neurospora crassa. Der Ausgangsstoff ist Histidin, das durch Methionin dreifach methyliert wird zu Hercynin; durch Anlagerung einer SH-Gruppe, die vom Cystein stammt, entsteht Ergothionein (Abb. 1).

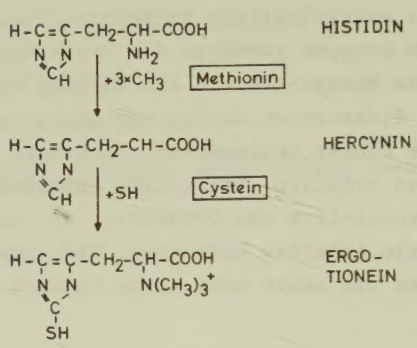


Abb.1 Die Biosynthese des Ergothioneins.

Abb. 1 Die Biosynthese des Ergothioneins

Hercynin wurde 1959 neben Ergothionein in Rindererythrozyten und in der Samenflüssigkeit von Ebern gefunden (ACKERMANN et al.).
Auch der Abbau des Ergothioneins wurde an Bakterien studiert. YANASUGONDHA und APPLEMAN (1957) beobachteten, daß Ergothionein durch Alkaligenes faekalis in Trimethylamin und Thiourocaninsäure gespalten wird. Es wurde auch ein zellfreier Extrakt aus Alkaligenes faekalis isoliert, der Ergothionein abbaut (KELLY und APPLEMAN, 1961).

BOOTH und APPLEMAN (1963) beschrieben, daß aus Thiourocaninsäure weiterhin Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Glutaminsäure entstehen; somit liegt eine hydrolytische Spaltung des Imidazolringes vor (siehe Abb. 2).

Auch Escherichia coli ist in der Lage, Ergothionein zu zerlegen (WOLFF, 1962). Hier erfolgt der Abbau ebenfalls durch Bildung von Trimethylamin und Thiourocaninsäure. Durch einen ergothioneinhaltigen Nährboden wird in dem Bakterium die Bildung einer Ergothionase induziert. Das Enzym ist streng substratspezifisch und hat sein pH-Optimum bei 8,5 bis 9,0. Die katalysierte Reaktion ist irreversibel. Als Enzymhemmer fungieren Jodacetat, para-Hydroxymercuribenzoat und auch Cystein in 0,05 M Lösung. Dagegen beeinträchtigt Glutathion die Reaktion nicht. WOLFF findet keine Erklärung für den unterschiedlichen Einfluß dieser beiden Substanzen.

1961 untersuchten WOLFF et al. den Ergothioneinstoffwechsel in Ratten. Definierte radioaktiv markierte Ergothioneinmengen wurden den Versuchstieren intraperitonäal injiziert. Es wurde festgestellt, daß der Ergothioneinabbau zum großen Teil in der Leber stattfindet. Durch Abspaltung der SH-Gruppe entsteht Hercynin, durch Verlust des Trimethylamins Urocaninsäure, die in Glutaminsäure umgewandelt wird. Über den Harnstoffzyklus wird schließlich Arginin gebildet (Abb. 2).

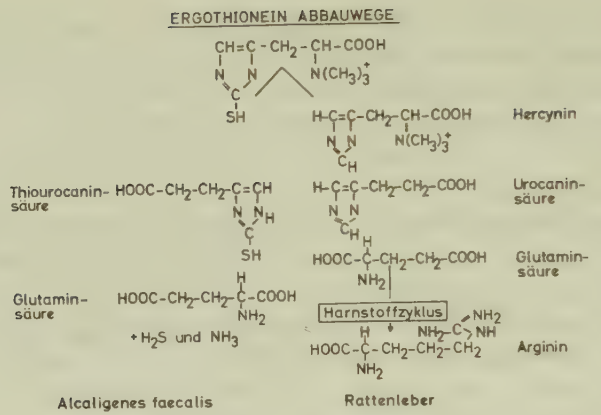


Abb. 2 Die verschiedenen Abbauwege des Ergothioneins

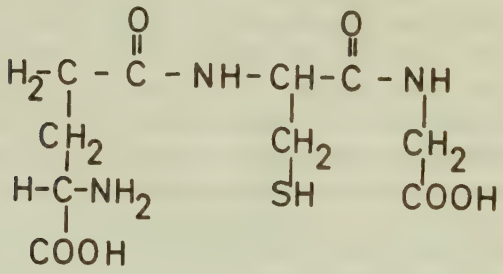
1958 beschrieben HEATH und TOENNIES die Oxidation des Ergothioneins zum Disulfid. Diese Reaktion geht nur in stark saurer Lösung vor sich, entweder durch Sauerstoff oder durch Wasserstoffsuperoxyd. Cystein und reduziertes Glutathion können Ergothionein wieder reduzieren. Unter physiologischen Verhältnissen liegt Ergothionein fast nur in reduzierter Form vor, durch einen Überschuß an reduziertem Glutathion wird es in dieser Form gehalten. Nur bei sehr saurer Reaktion ist das Disulfid so stabil, daß die oxydierte und die reduzierte Form nebeneinander vorkommen können.

Diese Oxydation wurde auch von KLEBANOFF (1962) beobachtet. Er fand als Aktivatoren Thyroxin und Östradiol. In Gegenwart von Katalase, die H_2O_2 in H_2O umwandelt, findet eine geringere Ergothioneinoxydation statt. Nach diesen Beobachtungen könnte Ergothionein in der Zalle als Protonendonator und -akzeptor eine Rolle spielen.

Über die klinische Bedeutung des Ergothioneins ist bisher wenig bekannt.
Die Substanz kommt in den Erythrozyten vor. Die Mengenangaben schwanken bei den einzelnen Autoren erheblich, da die Bestimmung mit Schwierigkeiten verbunden ist. HUNTER (1949) und FRASER et al. (1950) fanden Werte zwischen 10 und 15 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten, bei MELVILLE (1952) liegen die Ergebnisse wesentlich niedriger (siehe Tab. I). SALT stellte 1931 fest, daß die Ergothioneinkonzentration im Vollblut von Diabetikern, Rheumatikern, Lungentuberkulosekranken und Halbseitengelähmten erhöht ist. Der höhere Spiegel bei der Tuberkulose könnte dadurch erklärt werden, daß Mycobacterium tuberculosis das Ergothionein zu synthetisieren vermag (GENGHOF und VAN DAMME, 1964).
FRASER (1951) gibt einen Mittelwert von 18 mg% bei Tuberkulosekranken an, wobei der Wert umso niedriger sei, je weiter die Krankheit fortschreitet. Der gleiche Autor fand auch, daß die Ergothioneinkonzentration im Knochenmark höher liegt als im peripheren Blut. Außerdem beobachtete er bei Blutspendern einen Ergothioneinanstieg ungefähr 14 Tage nach dem Blutspendetermin.
LAWSON und RIMINGTON (1947) schrieben der Substanz eine antithyreoide Wirkung zu. Dies bestätigte LATNER, der 1948 bei Thyreotoxikosepatienten erniedrigte Ergothioneinwerte ermittelte.

2. BIOCHEMISCHE FUNKTIONEN DER SULFHYDRILGRUPPENHALTIGEN SUBSTANZEN IN DEN ERYTHROZYTEN

Wie schon erwähnt, haben die Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen eine große Bedeutung für den Stoffwechsel der roten Blutkörperchen. Da Cystein seiner geringen Menge wegen kaum Bedeutung hat, ist das Glutathion Repräsentant dieser Gruppe. Dessen Funktionen wurden in den letzten 10 Jahren genau untersucht (OSKI und NAIMAN , 1966).



GLUTATHION

Abb. 3 Struktur des Glutathion

Es handelt sich hierbei um ein Tripeptid aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glykokoll. Durch

An einanderlagerung zweier Moleküle entsteht das oxydierte Disulfid GSSG, das durch die Glutathionreductase immer wieder zum GSH reduziert wird. Coenzym der Reaktion ist $NADPH_2$, das im Pentosephosphatzyklus gebildet wird.
Diese Zusammenhänge verdeutlicht folgendes Schema (aus RIETKÖTTER, 1971):

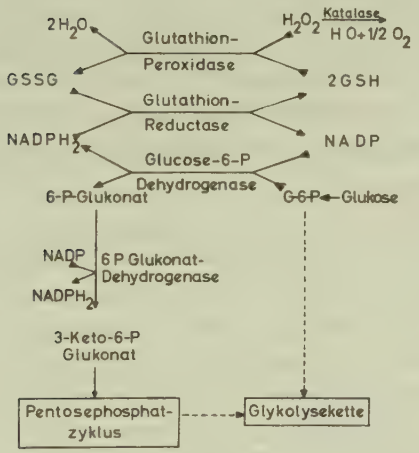


Abb. 4 Stoffwechsel des Glutathion

Durch die SH-Gruppe des Glutathions werden die Zellmembran, das Hämoglobin und SH-haltige Enzyme vor oxydativem Abbau geschützt. Dieser Mechanismus ist z.B. dann bedeutungsvoll, wenn in der Zelle H_2O_2 gebildet wird. Wie aus dem Schema ersichtlich, wird H_2O_2 durch die Glutathionperoxidase und GSH in Wasser umgewandelt und das Glutathion zu GSSG oxydiert. Dadurch werden der Tetrapyrrolring des Hämoglobins und die Membranproteine vor der Oxydation bewahrt.
Das Versagen der Schutzfunktion des Glutathions tritt bei Enzymmangelkrankheiten wie dem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase- oder dem Glutathionreduktasemangel ein. Die Glutathionreduktase reduziert oxydiertes Glutathion, die G-6-PDH regeneriert das für diese Reaktion wichtige Coenzym, das $NADPH_2$. Unter Einwirkung von Sulfonamiden, Antimalariamitteln oder Leguminosen kommt es bei einem Mangel an diesen Enzymen zu schweren hämolytischen Krisen.

3. BISHER ENTWICKELTE BESTIMMUNGSVERFAHREN DES ERGOTHIONEINS IN ERYTHROZYTEN

(Ergebnisse siehe Tab. I, Anhang)

a) Die Methode nach BEHRE und BENEDICT (1929)

BEHRE und BENEDICT deproteinisierten das Blut mit Molybdänsäure. Im proteinfreien Filtrat fällten sie das Ergothionein zusammen mit der Harnsäure durch Silberlaktat. Die Harnsäure wurde mit Hilfe von Hydrochlorsäure entfernt, das Silberlaktat in Zyanid gelöst. Dann wurde wie bei einer normalen Harnsäurebestimmung verfahren. Die Resultate blieben unbefriedigend, das Ergothionein war zu dieser Bestimmung nicht hinreichend zu isolieren.

b) Die Diazomethode nach HUNTER

1928 fand HUNTER, daß durch die Reaktion zwischen Ergothionein und diazotierter Sulfanilsäure eine Farbe entsteht, deren Intensität dem Gehalt an Ergothionein proportional ist. Diese Methode wurde 1949 von ihm selbst überarbeitet. Das Prinzip der Färbung besteht in folgendem Vorgang: Aus $NaNO_2$ und Salzsäure entsteht salpetrige Säure, die mit Sulfanilsäure das Diazoniumsalz bildet. Dieses kuppelt mit einer ergothioneinhaltigen Lösung zu einem Azofarbstoff mit rötlichem Farbton. HUNTER verwendet zu seinen Bestimmungen Vollblut, das er mit einer Essigsäureoxalatlösung behandelt, um Hämolyse und Eiweißkoagulation zu erzielen. Er zentrifugiert die Lösung und führt mit dem Überstand die beschriebene Färbung durch. Die Farbbildung wird leicht durch Cystein und Glutathion gestört, die mit bleihaltigem Goulard's Extrakt zur Präzipitation gebracht werden müssen. Die Bleirückstände werden mit Natriumdihydrogenphosphat ge-

fällt. Die Reaktion mit einem Diazoniumsalz ist nicht streng spezifisch für Ergothionein, da auch andere Substanzen mitreagieren, wie z.B. Tyrosin oder Histidin.

c) Die Diazomethode nach FRASER

FRASER modifizierte 1950 die HUNTERsche Methode. Von den Ergebnissen in Vollblut zog er einen - der jeweiligen Plasmamenge proportionalen - Wert ab, oder er entfernte das Plasma durch viermaliges Waschen der Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung. Er bestätigte, daß Substanzen wie Histidin und Tyrosin im Plasma eine Ergothioneinfärbung vortäuschen. Während des Waschvorgangs vermied er die Hämolyse, dieser Schritt folgte wie bei HUNTER mit einer Essigsäureoxalatlösung, für die von FRASER eine höchstmögliche Oxalatkonzentration festgesetzt wurde.

d) Die Diazomethode nach LATNER (1948)

LATNER hydrolysiert eine ergothioneinhaltige Lösung mit 10 n Natronlauge und behandelt sie dann mit Natriumnitrit und Sulfanilsäure. Es bildet sich ein roter Farbstoff.

Die genannten Formen der Diazofärbung führen zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Farbstoffbildung wird durch Substanzen, die ebenfalls mit dem Diazoniumsalz reagieren und nicht eliminiert werden, beeinflusst.

e) Die Diazomethode nach MELVILLE (1952)

Auch MELVILLE hat sich kritisch mit der HUNTERschen Methode auseinandergesetzt und folgende störende Substanzen gefunden: Die Aminosäuren Tyrosin, Histidin und Thiolhistidin, ferner Carnosin, Eisen-, Kupfer- und Ammonium-

ionen, Jod, Fluor, Schwefel, Alkohol, Phenole, Ketone, Bilirubin, Kreatinin, Digitonin und - wie auch HUNTER - Cystein und Glutathion. Nach seinen Ergebnissen ist die Vorbehandlung, d.h. die Entfernung aller dieser Störfaktoren, von entscheidender Bedeutung. MELVILLE wäscht daher die Blutproben zunächst in der 10fachen Menge isotonischer Kochsalzlösung. Dann hämolysiert er die Erythrozyten mit destilliertem Wasser. Durch reduzierendes Glutathion und Natriumdithionit wird ein Teil der Störfaktoren eliminiert, außerdem einem Ergothioneinverlust während der folgenden Schritte vorgebeugt: Eiweißfällung mit Trichloressigsäure, Zentrifugation, Ausschütteln des Überstands in Chloroform, Reaktion des Extrakts mit dem Ionenaustauscherharz Amberlite IRA-410, Diazofärbung mit einer größeren Menge der Untersuchungslösung und kleineren Volumina der stärker konzentrierten Reagentien, Extinktionsmessung bei 540 nm, um den störenden Einfluß etwaiger Histidinspuren zu vermeiden.

f) Die Bromidwassermethode nach TOUSTER (1951)

Diese Methode basiert auf einem anderen Prinzip. Es wird die Reaktion zwischen der Sulfhydrilgruppe des Ergothioneins und Brom ausgenutzt. Diese Reaktion findet mit Glutathion und Cystein nicht statt, da sie durch die Nachbarschaft der SH-Gruppe mit einem Kohlenstoff- und Stickstoffatom bedingt ist. Durch Oxydation entsteht das Sulfat, das mit Benzidin zur Präzipitation gebracht wird. Nach Zugabe von Natrium-b-naphthoquinon-4-sulfonat bildet sich ein Farbstoff, dessen Intensität photometrisch bestimmt werden kann. Auch TOUSTER fand, daß Plasmabestandteile wie Histidin und Tyrosin eine Ergothioneinanfärbung nach der HUNTERschen Methode vortäuschen.

Jedoch ist auch die Bromidwassermethode nicht spezifisch für Ergothionein und führt nicht zu quantitativ zuverlässigen Ergebnissen.

g) Die Diazomethode nach SAWINIEC (1967)

Ähnlich wie bei der Methode nach MELVILLE wird hier das Vollblut in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser zur Hämolyse gebracht. Weiterhin wird es mit Natriumsulfat und Trichloressigsäure behandelt. Die Lösung wird zentrifugiert, der Überstand einer Reinigung mit Chloroform und dem Ionenaustauscher Amberlite IRA-410 unterzogen. Es folgt eine Diazofärbung mit Hilfe von Citratpuffer, diazotierter Sulfanilsäure und 19 n NaOH.

4. EIGENE FRAGESTELLUNG

Wie einleitend ausgeführt, besteht bis heute keine Klarheit darüber, ob auch das Ergothionein eine Schutzfunktion für die Erythrozyten hat, wie sie oben für das Glutathion beschrieben wurde, oder ob ihm noch weitere Funktionen zukommen. Dies hängt vor allem damit zusammen, daß bis jetzt noch keine zuverlässige Methode zur Ergothioneinbestimmung zur Verfügung steht. Wie aus Tab. I hervorgeht, weichen die bisherigen Ergebnisse stark voneinander ab.

Wir versuchten, sowohl durch Modifikation bestehender Verfahren, als auch durch Entwicklung einer neuen Methode zu exakten und reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Anschließend bestimmten wir den Ergothioneingehalt in verschiedenen kindlichen Altersstufen, in retikulozytenreichem und -armem Blut und in alternden Blutkonserven. Durch die dabei gewonnenen Ergebnisse hoffen wir, zur Deutung der Funktion des Ergothioneins in den Erythrozyten beitragen zu können.

Parallel zu allen Ergothioneinbestimmungen wurde auch der Gesamtgehalt der Erythrozyten an Substanzen mit Sulfhydrilgruppen, repräsentiert durch das Glutathion, ermittelt. Dadurch konnte der Anteil des Ergothioneins an dieser Substanzengruppe festgestellt werden.

5. PROBANDEN UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Es wurde Blut von folgenden Personengruppen untersucht:

a) Frühgeborene mit einem Gewicht zwischen 1600 und 2200 g (n = 13)

b) Reife Neugeborene (n = 25)

c) Kinder im Alter von 1 - 5 Jahren (n = 12)

d) Erwachsene (n = 27)

e) Konservenblut * (n = 3)

Es wurde nur Blut von klinisch gesunden Probanden untersucht, bei denen alle hämatologischen Werte altersentsprechende Normaldaten ergaben und die normale BSG, Elektrophorese und Leber- und Nierenfunktionen aufwiesen.

Die Blutkonserven stammten von Routinespendern, die unter ständiger Überwachung stehen.

*) Herrn Professor Dr.K.Müller, Leiter des Bluttransfusionsdienstes und Blutgerinnungslaboratoriums, danken wir für die freundliche Überlassung der Blutkonserven.

6. METHODIK

a) Reagentien und Lösungen

I. Ergothionein MG 256,33. Firma SIGMA,St.Louis,Mo.USA
Testlösung 5 mg/100 ml aqua bidest.

II. ACD-Blutstabilisator nach USP XVII, Formel B:
13,2 g Trinatriumcitrat x 2 H_2O MG 294,10
4,4 g Zitronensäure, kristallwasserfrei MG 210,14
14,7 g Saccharose x H_2O
Aqua bidest. ad 1000 ml

III. 0,9 %ige gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4:
18,0 g NaCL, MG 58,44
2,7 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, MG 177,99
4,9 g NaH_2PO_4 x H_2O, MG 137,99
in 2,21 aqua bidest. lösen

IV. 1 n Essigsäurelösung:
60,05 ml einer 99-100 %igen Essigsäurelösung, MG 60,05, aqua bidest. ad 1000 ml

V. 0.003 n Essigsäurelösung:
3 ml der 1 n Stammlösung,
aqua bidest. ad 1000 ml, dazu
160 mg di Natriumoxalat $C_2Na_2O_4$, MG 134,0

VI. 0,0045 n Essigsäurelösung:
4,5 ml der 1 n Stammlösung,
aqua bidest. ad 1000, dazu
160 mg di-Natriumoxalat

VII. 0,005 n Essigsäurelösung:
5,5 ml der 1 n Stammlösung,
aqua bidest. ad 1000, dazu
160 mg di-Natriumoxalat

VIII. Goulard's Extrakt:

22 g Blei-II-Acetat $(CH_3COOH)_2xPb \times 3\ H_2O$,
MG 379,33
14 g Blei-II-Oxid PbO, MG 223,19
in ca. 100 ml CO_2freiem Wasser lösen.
30 Minuten unter Luftabschluß kochen,
mit Wasserstrahlpumpe filtrieren,
mit CO_2freiem Wasser auf 100 ml auffüllen. Extrakt streng verschlossen aufbewahren!

IX. 10 %ige Natriumdihydrogenphosphatlösung:

10 g $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, MG 177,99,
aqua bidest. ad 100 ml

X. Diazoreagens:

a) 9 g Sulfanilsäure $C_6H_7NO_3S$, MG 173,19
90 ml 37 %ige HCL, MG 36,46
aqua bidest. ad 1000 ml
b) 5 g Natriumnitrat $NaNO_2$, MG 69,00,
aqua bidest. ad 100 ml

Reagens zu jeder Bestimmung frisch ansetzen!
Bei +4°C aufbewahfen!
1,5 ml Lösung a)
1,5 ml Lösung b). Nach 5 Minuten
6,0 ml Lösung b). Nach 5 Minuten eiskaltes aqua bidest. ad 50,0 ml. Umschütteln.

XI. Alkalipuffer:

1 g Natriumcarbonat wasserfrei Na_2CO_3, MG 105,99
10 g Natriumacetat CH_3COONa, MG 82,03
aqua bidest. ad 100 ml

XII. 10 n Natronlauge:

100 g NaOH, MG 40,00
aqua bidest. ad 250 ml

XIII. Eiweißfällungslösung zur Glutathionbestimmung nach BEUTLER:

16,7 g meta-Phosphorsäure in Stangen, $(HPP_3)n$
mechanisch zum Pulver zerkleinern
2 g EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x 2 H_2O, MG 372,24
300 g NaCL MG 58,44
aqua bidest. ad 1000 ml

XIV. 0,3 m Phosphatpuffer:

53,397 g Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 x2H_2O
MG 177,99
aqua bidest. ad 1000 ml

XV. Reagens zur Färbung wasserlöslicher SH-Gruppen:

40 mg DTNB (5,5 Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure))
$C_{14}H_8N_2O_8S_2$, MG 396,36 (Ellman's Reagens)
1 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat $C_6H_5Na_3O_7x2H_2O$
MG 294, 10
aqua bidest ad 100 ml

XVI. Perchlorsäure ($HClO_4$), MG 100,46

XVII. Chloroform ($CHCl_3$), MG 119,38

XVIII. Cellulose DE 52

XIX. Cellulose CM 23 Firma Wathman, Maidstone, England.

XX. 0,15 m Kaliumchlorid:

74,56 g KCl, MG 67,56
aqua bidest. ad 1000 ml

XXI. Baumwolle, ungebleicht

XXII. Aceton CH_3COCH_3, MG 58,08

XXIII. Phosphatpuffer, pH 6,6:

Lösung a) 2,5 g Natriumhydrogenphosphat
Na_2HPO_4 x 2 H_2O, MG 177,99,
aqua bidest. ad 100 ml

Lösung b) 0,95 g Kaliumdihydrogenphosphat

KH_2PO_4, MG 136,09

aqua bidest. ad 100 ml

37,2 ml Lösung a)

62,8 ml Lösung b)

XXIV. NADPH $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$ x 2 H_2O MG 869,39

32,6 mg pro 1 ml aqua bidest.

XXV. 0,018 m Wasserstoffsuperoxydlösung:

0,612 g H_2O_2 MG 34,01

aqua bidest. ad 1000 ml

XXVI. Glutathionreductase 5 IU/mg Eiweiß

Filterpapier, Marke Selecta, Carl Schleicher u. Schüll Nr. 597/L Durchmesser 7 cm

==========

Die anorganischen Reagentien stammen von der Firma
E.MERCK, 61 Darmstadt, Postfach 4119.
Die organischen Reagentien stammen von der Firma
BOEHRINGER, 68 Mannheim 31, Postfach 51.

Bei speziellen Reagentien wurden die Firmen direkt vermerkt.

b) Apparate

Kühlzentrifuge der Firma HERAEUS-CHRIST
336 Osterode/Harz, Postfach 1220.

Photometer der Firma EPPENDORF Gerätebau Netheler und Hinz GmbH
2000 Hamburg 63, Am Hehsel 38.

Filter 509 nm
Filter 405 nm

Lyophilisator der Firma HERAEUS-CHRIST

Labotron Chromatocord Mikroaminosäureanalysator
8161 Gelting, Wolfratshauserstr. 2

c) Ergothioneinbestimmung nach HUNTER

0,5 ml Vollblut
+4,5 ml 0,0045 n Essigsäureoxalatlösung (Reagenz VI)
bis zur vollständigen Hämolyse umschütteln.
2 Minuten lang unter Rühren im Wasserbad erhitzen, bis alles Eiweiß koaguliert ist.
Zentrifugieren, Überstand abdekantieren.
1 Tropfen (0,05 ml) Goulard's Extrakt (Reagenz VIII)
umschütteln, zentrifugieren, Überstand dekantieren.
1 Tropfen Natriumdihydrogenphosphatlösung (Reagenz IX)
zentrifugieren, Überstand dekantieren. --
Färbung im Eisbad durchführen! Dazu:
1 ml aqua bidest.
1 ml Diazoreagenz (Reagenz X)
2 ml Alkalipuffer (Reagenz XI)
1 ml Untersuchungslösung
umschütteln, Entwicklung eines zitronengelben Farbstoffs. Exakt 45 Sekunden kuppeln lassen, dann
5 ml 10 n Natronlauge (Reagenz XII).
Röhrchen aus dem Eisbad nehmen, auf Zimmertemperatur anwärmen, bis alle Luftbläschen verschwunden sind.
Entwicklung eines rot-violetten Farbstoffes.
Intensität bei einer Wellenlänge von 510 nm photometrisch messen.

Herstellung des Leerwertes:
2 ml aqua bidest.
1 ml Diazoreagenz (Reagenz X)
2 ml Alkalipuffer (Reagenz XI)

Die Untersuchungslösung ist durch aqua bidest. ersetzt, die Konzentrationen der Reagentien sind somit identisch mit denen der Teströhrchen.

d) GSH-Bestimmung nach BEUTLER (1963)

Vorbemerkung: Die BEUTLERsche Methode ist für die Verarbeitung von Vollblut angegeben. Um Vergleiche mit den Ergothioneinbestimmungen anstellen zu können, haben wir mit gewaschenen Erythrozyten gearbeitet; Waschvorgang siehe unter:
Endgültiges eigenes Vorgehen, Modifikation der Methode nach HUNTER

0,2 ml gewaschene Erythrozyten und
1,8 ml aqua bidest. schütteln, Hämolyse abwarten. Dann Zugabe von
3 ml Eiweißfällungslösung (Reagenz XIII). Wieder umschütteln. Es kommt zu einer bräunlichen Ausflockung des Eiweißes. 5 Minuten warten, dann filtrieren.
2 ml des Filtrates, das wasserklar sein soll, zu
8 ml Phosphatpuffer (Reagenz XIV) geben, dazu
1 ml DTNB (Reagenz XV).
Nach dem Umschütteln entsteht ein zitronengelber Farbstoff.
Extinktion bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmen.

Herstellung des Blindwertes:

Die Eiweißfällungslösung (Reagenz XIII) mit aqua bidest. im Verhältnis 3:2 verdünnen, um ihre Konzentration mit der Untersuchungslösung vergleichen zu können.
2 ml der verdünnten Eiweißfällungslösung zu
8 ml Phosphatpuffer (Reagenz XIV) pipettieren, dazu
1 ml DTNB-Reagenz (Reagenz XV).

Der Gehalt an Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen errechnet sich nach den Formeln:

GSH-Gehalt in mg/100 ml gepackte Erythrozyten =

E x 310,4 x 1,01 x 100 : Hämatokrit

GSH-Gehalt in mg/ 10^{11} Erythrozyten =

E x 310,4 x 1,01 : Erythrozyten pro mm^3 in Mill.

Rechenbeispiel:

E	= 0,121
Hkt	= 61,0 %
Ery i. Mill/mm^3	= 6,10

GSH-Gehalt in mg/100 ml gepackte Erythrozyten =

0,121 x 310,4 x 1,01 x 100 : 61,0 = 62,1

GSH-Gehalt in mg/ 10^{11} Erythrozyten =

0,121 x 310,4 x 1,01 : 6,10 = 6,21

==========

e) GSSG-Bestimmung nach RACKER (1965)

1 ml Untersuchungslösung und
0,1 ml 0,018 M Wasserstoffperoxyd (Reagenz XXV).
0,1 ml dieses Gemisches mit
1 ml Phosphatpuffer (Reagenz XXIII) und
0,02 ml NADPH (Reagenz XXIV) zusammengaben, Start mit
0,0025 ml GSSG-Reductase (Reagenz XXVI).

Die eintretende enzymatische Reaktion ist bei einer Wellenlänge von 366 nm photometrisch zu verfolgen.

f) Chloroform - Ausschüttelung

Die Untersuchungslösung wird mit mehreren Volumina Chloroform in einen Scheidetrichter gegeben. Dieser wird 10 Min. lang kräftig geschüttelt. In Ruhe trennen sich die beiden Phasen; das Chloroform befindet sich mit allen Stoffen, die sich in ihm gelöst haben, unten und kann aus dem Scheidetrichter abgelassen werden.

g) Vorbereitung der CM 23-Cellulose

3 g Cellulose und
50 ml 0,5 n Natronlauge 30 Min. lang unter gelegentlichem Schütteln miteinander reagieren lassen.
Base abgießen, Cellulose in aqua bidest waschen, bis das abgegossene Wasser ein pH von 8,0 hat.
50 ml 0,5 n Salzsäure zugeben, 30 Min. lang mit der Cellulose unter gelegentlichem Schütteln reagieren lassen. Säure abgießen, Cellulose in aqua bidest. waschen, bis das abgegossene Wasser ein pH von 5,5 hat.

h) Anwendung der Ionenaustauschercellulose

1. Diäthylaminoäthylcellulose DE 52 (Reagenz XVIII)
Die Untersuchungslösung (vor der Diazofärbung nach HUNTER ca. 3,5 ml) wird zu
250 mg der Cellulose gegeben. 20 Min. lang unter gelegentlichem Schütteln reagieren lassen. Lösung dann filtrieren.
2. CM 23-Cellulose (Reagenz XIX)
1 ml Celluloselösung (hergestellt wie oben beschrieben) und ca. 3,5 ml Untersuchungslösung.

15 Min. Reaktionszeit, Lösung dann durch einen Filter gießen (Filterpapier Nr. 597/L). Das Filtrat quantitativ zu
1 ml frischer Celluloselösung geben. Vorgang wiederholen, dann vakuumfiltrieren.

i) Blutfiltrierung durch Baumwolle (BUSCH, 1966)

Ein am Boden aufgebohrtes, spitzes, 10 ml fassendes Reagenzglas wird mit einem langen Baumwollfaden bis zu drei Vierteln gestopft. Zur Quellung Kaliumchlorid zugeben. Nach Ablaufen des KCl Blut in kleinen Mengen durchlaufen laasen.

j) Retikulozytenanreicherung (WITT et al., 1968)

Gewaschene Erythrozyten bei + 4° C und 10 000 x g 30 Min. lang zentrifugieren. Überstand dekantieren.
0,5 ml der obersten Zellschicht vorsichtig abheben.
Mittlere Zellschicht verwerfen.
Bodenfraktion von 0,5 ml gewinnen.
Fraktionen einzeln waschen, in physiologischer Kochsalzlösung resuspendieren. Hämatokrit, Zellzahl und Retikulozytenzahl ermitteln.

k) Statistische Sicherung der Versuchsergebnisse *

Für den statistischen Vergleich zweier Mittelwerte benutzten wir die T-Verteilung nach STUDENT.

Zuerst wird der Mittelwert einer Versuchsreihe bestimmt. Daraufhin wird die mittlere quadratische Abweichung des Einzelwertes, die Standardabweichung ermittelt:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n-1}}$$

Dabei bedeutet x die Abweichung vom Mittelwert, n die Anzahl der Versuchspersonen.
Die Standardabweichung des Mittelwertes M aus n Messungen ist definiert als:

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Dann wird die Standardabweichung der Differenz D zwischen den Mittelwerten M_1 und M_2 zweier Versuchsreihen errechnet und der t-Wert ermittelt:
Man bedient sich der Gleichung:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{\sigma_{M_1}^2}{n_1} + \frac{\sigma_{M_2}^2}{n_2}}}$$

Nach folgender Gleichung wird die Anzahl der Freiheitsgrade bestimmt:

$$m = n_1 + n_2 - 2$$

Der zugehörige p-Wert ist der Tabelle

"Signifikantschranken der Studentverteilung"
(Documenta Geigy, 1960)

zu entnehmen.
Bei Versuchen mit biologischem Material nimmt man im allgemeinen einen statistisch signifikanten Unterschied an, wenn $p \leq 0{,}05$ ist.

==========

*) An dieser Stelle möchten wir den Mitarbeitern des Institutes für medizinisch-biologische Statistik und Dokumentation für ihre Unterstützung bei der statistischen Sicherung unserer Versuchsergebnisse danken!

7. EIGENE METHODISCHE VERSUCHE UND DEREN ERGEBNISSE

a) Färbung der wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen mit DTNB

Bei der Suche nach einer exakten Methode zur Bestimmung des Ergothioneins tauchte der Gedanke auf, nach einer sorgfältigen Fällung des Glutathions und Cysteins die von BEUTLER angegebene Färbung der wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen mit DTNB zu versuchen.

I. Es wurde zunächst die Wirkung des DTNB auf reine Ergothioneinlösung untersucht.

II. Darauf wurde die Färbung mit DTNB an einer Blutprobe vorgenommen, die nach der HUNTERschen Methode zunächst hämolysiert, dann deproteinisiert und mit Goulard's Extrakt und Natriumdihydrogenphosphat behandelt worden war. Mit dem so vorbereiteten Blutextrakt wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

III. Zur Erhöhung der Ergothioneinkonzentration wurde der Extrakt vor der Färbung lyophilisiert. Um festzustellen, ob durch die Lyophilisation ein Verlust an Ergothionein eingetreten war, wurde ein Teil der Untersuchungslösung unlyophilisiert verarbeitet.

IV. Wir versuchten, mit kleineren Volumina und höheren Konzentrationen der Reagentien zu arbeiten. Die Mengenverhältnisse wurden vielfach variiert.

V. Es wurden Standardreihen mit reiner Ergothioneinlösung hergestellt. Dabei wurden die Extinktionen der einzelnen Proben einmal direkt nach der Färbung und ein weiteres Mal nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bestimmt.

VI. Da der Verdacht bestand, die Ergothioneinlösung könnte Verunreinigungen enthalten, wurde sie vor der Färbung mit Chloroform ausgeschüttelt.

VII. Zur weiteren Reinigung wurde Ionenaustauschercellulose verwandt.

VIII. Ferner testeten wir den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Färbung mit DTNB. Normalerweise ergab sich ein pH von 8,0. Durch Zugabe von einigen Tropfen Säure bzw. Lauge wurde dies verändert.

Die Ergebnisse zu diesem Teilabschnitt lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Zu I. Das Reagenz bewirkte in Anwesenheit von reinem Ergothionein die Entwicklung eines zitronengelben Farbstoffes, ähnlich dem, der bei der Glutathionbestimmung entsteht.

Zu II. Durch die Behandlung eines nach der HUNTERschen Methode vorbereiteten Blutextraktes mit DTNB bildete sich keine photometrisch feststellbare Farbe.

Zu III. Auch nach Lyophilisation der Lösung war das Ergothionein nicht so rein dargestellt und angereichert, daß sich ein Farbstoff entwickeln konnte.

Zu IV. Durch vielfältige Mengen- und Konzentrationsänderungen der Reagentien erreichten wir kein Konzentrationsverhältnis, bei dem die Farbreaktion regelmäßig eingetreten wäre. Einmal erhielten wir bei der Färbung von lyophilisiertem Blutextrakt Extinktionswerte, die zwar proportional zu den Extraktmengen in den Proben anstiegen, jedoch so niedrig waren, daß sie nicht im optimalen Meßbereich der Photometer lagen (Abb. 5).

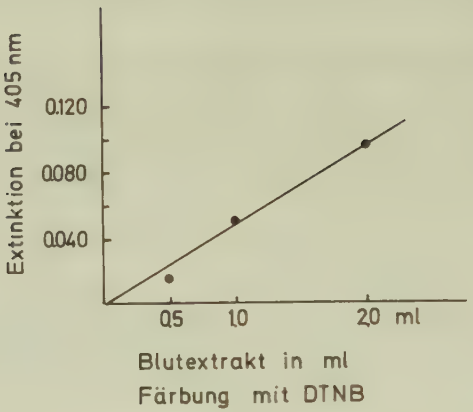
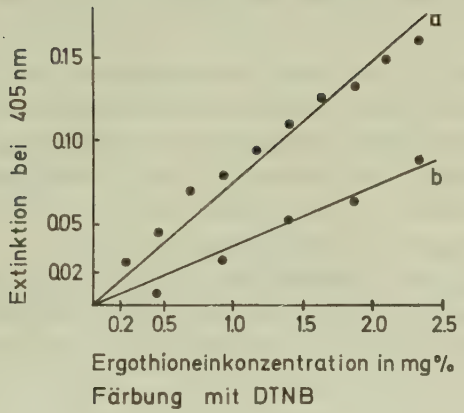


Abb. 5 Färbung eines Blutextraktes mit DTNB

Zu V. Unter Verwendung von reiner Ergothioneinlösung konnte eine Standardreihe aufgestellt werden, die ein lineares Verhältnis von Extinktion zu Substrat in einem günstigen Meßbereich aufwies. Bei der erneuten Extinktionsbestimmung nach einer Stunde jedoch lagen die Werte wesentlich niedriger, da sich in der Zwischenzeit der Leerwert gelb angefärbt, die einzelnen Proben sich aber nicht in gleichem Maße intensiviert hatten. Dadurch wurden die Extinktionsdifferenzen geringer. Ein weiterer Versuch, eine Standardreihe aufzustellen, führte bei der graphischen Auftragung nicht zum Schnitt der Abszisse im Nullpunkt und nicht zu exakter Proportionalität (Abb. 6 u. 7).



a) Messung unmittelbar nach der Färbung
b) Messung nach einer Reaktionszeit von einer Stunde

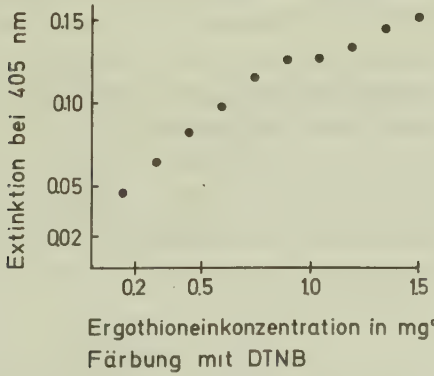


Abb. 6 und 7 Standardansätze. Färbung mit DTNB

Zu VI und VII. Durch die Verwendung von Chloroform und Ionenaustauschercellulosen konnte keine Verbesserung erzielt werden.

Zu VIII. Wir stellten fest, daß der Wirkungsgrad des DTNB sehr von der herrschenden Wasserstoffionenkonzentration abhängt. Schon eine geringfügige Änderung des pH zur sauren Seite hin führte zu einem beträchtlichen Abfall in der Farbkonzentration, eine Alkalisierung dagegen bewirkte eine Farbintensivierung.
Alle Versuche, die DTNB-Methode für die Ergothioneinbestimmung zu modifizieren, hatten zu unbefriedigenden Ergebnissen geführt. Wir wandten uns deshalb der Diazomethode zu.

b) HUNTERsche Diazomethode, ihre Modifikationen (MELVILLE) und eigene Variationen

I. Wir testeten verschiedene Säuren auf ihre Eignung zur Eiweißfällung; neben Essigsäureoxalatlösung verwandten wir Metaphosphor- und Perchlorsäure.

II. Um in dem Extrakt, der aus einer Blutprobe durch Hämolyse, Eiweißfällung und Behandlung mit Goulard's Extrakt gewonnen war, die Ergothioneinkonzentration zu erhöhen, führten wir vor der Diazofärbung eine Lyophilisation durch.

III. Zur Entfernung etwaiger chloroformlöslicher Substanzen, die Einfluß auf die Färbung nehmen könnten, wurde der Extrakt in Chloroform ausgeschüttelt.

IV. Darüberhinaus wurde eine Reinigung mit den Ionenaustauschercellulosen DE 52 und CM 23 getestet.
Diese Reinigungsschritte wurden in Verbindung mit der Diazofärbung sowohl einzeln als auch kombiniert angewandt.

V. Um beurteilen zu können, ob die Cellulosearten zur Elimination der Aminosäuren beitragen, die die Färbung beeinträchtigen könnten, wurde der Blutextrakt nach den einzelnen Reinigungsschritten einer Aminosäureanalyse unterzogen (LINNEWEH et al., 1969). Es wurde eine Analyse an dem unbehandelten Extrakt vorgenommen, eine nach Verwendung der CM 23-Cellulose und eine dritte nach Gebrauch der DE 52-Cellulose.

VI. Durch die Versuche, Ergothionein mit DTNB anzufärben, sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Untersuchungslösung nach Behandlung mit Goulard's Extrakt tatsächlich frei von reduziertem Glutathion ist. Diese Substanz würde zu einer starken Farbentwicklung führen. Mit der Methode von RACKER (1965) untersuchten wir, ob die Lösung noch oxydiertes Glutathion enthält.

VII. Goulard's Extrakt wurde, nach den HUNTERschen Angaben hergestellt, kein klares Reagenz, sondern eine weiß-flockige Flüssigkeit, die nicht die notwendige Ausflockung in der Untersuchungslösung bewirkte. HUNTER stellte das Reagenz mit destilliertem Wasser her, gibt es durch einen normalen Filter und benutzt erst zur Spülung des Filters kohlendioxydfreies Wasser. Wir untersuchten, ob die grundsätzliche Verwendung von CO_2freiem Wasser, Kochen unter Luftabschluß und Filtrieren mit der Wasserstrahlpumpe zu einem klaren Reagenz führt .

VIII. Durch die Diazofärbungen entstand nicht immer der beschriebene rotviolette Farbstoff. Die Zeitabstände zwischen der Zugabe der einzelnen Reagentien und der Testlösung wurden variiert.

IX. Bei den bisherigen Methoden wurden die Bestimmungen teilweise in Vollblut, teilweise auch an gewaschenen oder

ungewaschenen Erythrozyten durchgeführt.
Wir untersuchten, ob Substanzen im Plasma und auf der Erythrozytenmembran die Diazofärbung beeinflussen, ferner ob sich eine Nahrungsaufnahme auf den Ergothioneinspiegel auswirkt.

1. Wir bestimmten den Ergothioneingehalt im Nüchternblut und bei denselben Probanden zwei Stunden nach einer kräftigen Mahlzeit.
2. Wir nahmen Parallelbestimmungen an Vollblut, ungewaschenen und gewaschenen Erythrozyten und im Plasma vor.
3. Um sicher zu sein, daß durch den Waschvorgang kein Verlust an Ergothionein eintritt, führten wir nach dem Waschen in der abzentrifugierten physiologischen Kochsalzlösung ebenfalls eine Bestimmung durch.

X. Wir untersuchten, ob sich die Filtrierung der gewaschenen Erythrozyten durch Baumwolle (BUSCH und PELZ, 1966), bei der vielleicht noch vorhandene Leukozyten und Thrombozyten von den Erythrozyten getrennt werden, günstig auf die Ergothioneinbestimmung auswirkt.

XI. Versuchsweise wurde zur Hämolyse der gewaschenen Erythrozyten zweimaliges Einfrieren und Auftauen angewandt. Das Erythrozytenstroma wurde anschließend abzentrifugiert.
Damit wollten wir weitere sulfhydrilgruppenhaltige Substanzen, die in der Blutkörperchenmembran lokalisiert sind und die Färbung stören könnten, entfernen.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und Modifikationen können wie folgt zusammengefaßt werden:

Zu I. Die Deproteinisation ließ sich durch Verwendung von Metaphosphor- oder Perchlorsäure nicht verbessern oder vereinfachen; die Ergothioneinbestimmung ergab in den ver-

schiedenen behandelten Untersuchungslösungen ungefähr gleiche Werte.

Zu II. Die Lyophilisation der Untersuchungslösung erwies sich als unnötig, da die Ergothioneinkonzentration hoch genug war, um mit dem Diazoniumsalz einen intensiven Farbstoff entstehen zu lassen.

Zu III und IV. Um zu entscheiden, ob die Reinigung des Blutextraktes mit Chloroform und Cellulose von Vorteil ist, bestimmten wir den Ergothioneingehalt an drei Parallelproben, von denen die eine unvorbereitet gefärbt wurde. Die zweite wurde vor der Färbung mit Chloroform und CM 23-Cellulose behandelt, die dritte mit Chloroform und DE 52-Cellulose. Die Färbung wurde jeweils mit ansteigenden Mengen Untersuchungslösung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in ein Diagramm eingetragen (Abb.8).

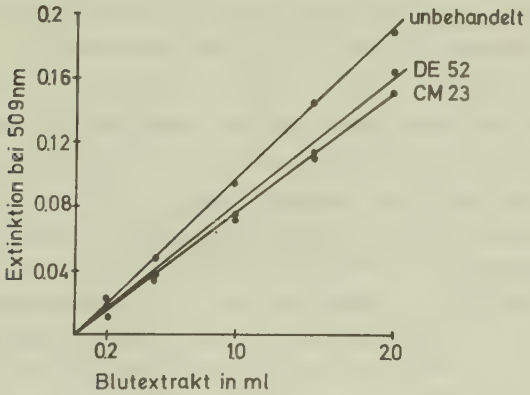


Abb. 8 Färbung verschieden vorbehandelter Proben

Die Abbildung zeigt, daß die einzelnen Meßpunkte in jedem Fall auf einer Geraden lagen. Die Meßpunkte von Extrakt II und III deckten sich fast und lagen etwas unter denen der unvorbereiteten Lösung.

Zu V. In allen drei Proben wurde ferner eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Die Analyseergebnisse gibt die Tabelle II (Anhang) wieder. Aus ihr geht hervor, daß in der Aminosäurenzusammensetzung durch die zusätzliche Behandlung keine deutliche Änderung eingetreten ist.
Auf Grund dieser Ergebnisse verwarfen wir den Gedanken einer zusätzlichen Reinigung des Extraktes mit Chloroform und Cellulosen wieder.

Zu VI. Wie auf S. 31 ausgeführt, entstand durch die Reaktion von DTNB mit einer nach HUNTER vorbereiteten Blutprobe kein gelber Farbstoff. Durch die Wirkung von Goulard's Extrakt war also das gesamte reduzierte Glutathion eliminiert worden. Bei der enzymatischen GSSG-Bestimmung nach RACKER ließ sich keine Reaktion verfolgen. Auch oxydiertes Glutathion als eventuelles Hemmnis der Färbung ist somit in dem Extrakt nicht mehr vorhanden.

Zu VII. Wir stellten fest, daß die Herstellung von Goulard's Extrakt zuverlässig gelang, wenn mit CO_2freiem Wasser unter Luftabschluß gearbeitet wurde.

Zu VIII. Bei der Diazofärbung bildete sich häufig ein gelber Farbstoff, dessen Extinktion sehr niedrig war und keine Proportionalität zu dem Ergothioneingehalt in der Lösung aufwies. Wir vermuteten, daß die Bildung des Farbstoffes von den Konzentrationen der vorhandenen Reagentien abhängt. Diese wiederum ändern sich in Abhängigkeit von der Zeit, während der die Reagentien vor der Zugabe der ergothioneinhaltigen Probe miteinander reagieren können.

Das Diazoniumsalz wird durch die Reaktion mit dem Alkalipuffer offensichtlich zu einem Stoff umgesetzt, der mit Ergothionein nicht mehr unter Bildung eines Farbstoffes reagieren kann. Die Abhängigkeit der Reaktion des Diazoniumsalzes mit der ergothioneinhaltigen Untersuchungslösung, von der Zeit, während der das Diazoniumsalz vorher durch den Alkalipuffer inaktiviert werden konnte, zeigt Abb. 9.

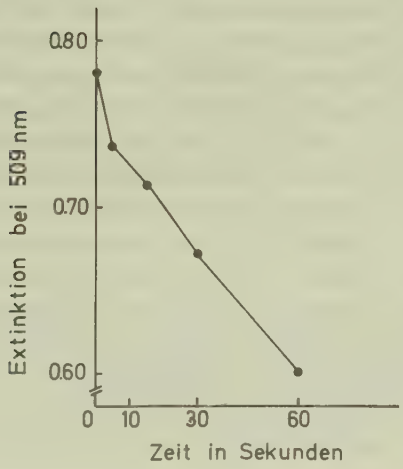


Abb. 9

Je länger diese Reaktionszeit, umso geringer die nachfolgende Reaktion mit dem Ergothionein und umso geringer die Farbstoffbildung. Um immer gleiche Mengen des unabgebauten Diazoniumsalzes zur Verfügung zu haben, legten wir die Reaktionszeit auf exakt 30 Sekunden fest, d.h. die Untersuchungslösung wurde 30 sec nach Zusammengabe des Diazoniumsalzes und Alkalipuffers dazu pipettiert.

Zu IX.

1. Bei vergleichenden Bestimmungen an Nüchternblut und nach den Mahlzeiten zeigte es sich, daß nur bei der Verarbeitung von Nüchternblut regelmäßig mit der Bildung des violetten Farbstoffes gerechnet werden konnte. Anderenfalls kam es häufig zu einer unerwünschten Gelbfärbung. In einem Beispiel erhielten wir bei der Bestimmung nach einer kräftigen Mahlzeit zwar den erwarteten violetten Farbstoff; dessen Intensität ergab jedoch mehr als 200 % des Wertes, der im Nüchternblut des gleichen Probanden ermittelt worden war. Dabei war die Gesamtheit der Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen in beiden Fällen annähernd gleich groß. Diese Tatsache läßt vermuten, daß der höhere Wert nach der Mahlzeit durch den Einfluß von Nahrungsbestandteilen zustande gekommen ist und keiner echten Ergothioneinvermehrung entspricht. Diese hätte sich auch in einem Anstieg des Wertes für die gesamten sulfhydrilgruppenhaltigen Substanzen bemerkbar machen müssen.

Das Testergebnis bei einer gesunden Versuchsperson (Mengenangaben in mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten):

Nüchtern:	Ergothioneingehalt	2,31
	Gesamt-SH	66,5
Nach einem reichhaltigen Frühstück:		
	Ergothioneingehalt	4,77
	Gesamt-SH	66,68

Um den Einfluß der Nahrungsaufnahme auszuschließen, wurden die Bestimmungen deshalb grundsätzlich in Nüchternblut ausgeführt.

2. Durch die Parallelbestimmungen des Ergothioneingehaltes in Vollblut, ungewaschenen und gewaschenen Erythrozyten und Plasma kamen wir zu dem Schluß, die Bestimmungen nur an gewaschenen Erythrozyten vorzunehmen. Aus Tabelle III (Anhang) geht hervor, daß die Gesamtheit der sulfhydrilgruppenhaltigen Substanzen, bestimmt in Vollblut und Erythrozyten, ungefähr gleich groß, ihr Wert im Plasma aber minimal ist. Der Ergothioneingehalt dagegen zeigt große Unterschiede. Bei der Bestimmung in Vollblut wird ein wesentlich höherer Spiegel gefunden als in gewaschenen Erythrozyten. Die Differenz dieser Werte entspricht ungefähr dem Wert, der im Plasma ermittelt wird. Daß hier keine SH-gruppenhaltige Substanz wie das Ergothionein angefärbt sein kann, wird klar, wenn man den Wert mit dem entsprechenden Ergebnis der Gesamt-SH-Bestimmung vergleicht, die mit der BEUTLERschen Methode erreicht wird. Der scheinbare Ergothioneingehalt ist wohl durch die Aminosäuren Tyrosin und Histidin bedingt.

3. Bei der Diazofärbung in der nach dem Waschen einer Blutprobe abzentrifugierten physiologischen Kochsalzlösung zeigte sich keine Farbstoffbildung. Daraus kann gefolgert werden, daß durch den Waschvorgang kein Ergothionein verloren geht.

Zu X. Die Filtrierung der Erythrozyten durch Baumwolle zeigte keinen besonderen Einfluß auf die Ergothioneinbestimmung.

Zu XI. Ebensowenig verbesserte sich die Ergothioneinbestimmung nach der Hämolysierung der roten Blutkörperchen durch

Einfrieren in Trockeneis und nachfolgendes Abzentrifugieren des Erythrozytenstromas.

c) Endgültiges eigenes Vorgehen.
Modifikation der HUNTERschen Diazomethode

Nüchternblut in ACD Formel B (Reagenz II) abnehmen

Waschen: 1 Volumen Blut und
10 Volumina gepufferte isotonische Kochsalzlösung (Reagenz III)
bei +4°C und 170 x g (3000 Upm) 10 min lang zentrifugieren. Überstand abpipettieren. Mit dem Bodensatz Waschvorgang zweimal wiederholen. Erythrozytensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Hämatokrit von 50 bis 70 % einstellen. Hämatokrit und Erythrozytenzahl pro mm^3 bestimmen.

Eiweißfällung: 0,5 ml Erythrozytensuspension und
4,5 ml Essigsäureoxalatlösung (Reagenz V) zur Hämolysierung umschütteln. 4 min lang unter Rühren im siedenden Wasserbad kochen lassen, bis die Eiweißkoagulation vollständig ist. Abkühlen, klaren Überstand abfiltrieren.

Zu dem Filtrat: 0,05 ml Goulard's Extrakt (Reagenz VIII). Den weißen Niederschlag bei 1800 x g (5500 Upm) 10 min lang abzentrifugieren, Überstand dekantieren.

Zu dem Überstand: 0,05 ml Natriumdihydrogenphophat (Reagenz IX) geben, den weißen Niederschlag wie oben abzentrifugieren, Überstand dekantieren und Färbung ausführen.

Färbung: Färbung im Eisbad durchführen!
1 ml aqua bidest,
1 ml Diazoreagenz (Reagenz X) und

2 ml Alkalipuffer (Reagenz XI). Nach genau 30 sec Zugabe von

1 ml Untersuchungslösung. Bildung eines blaßgelben Farbstoffs. Zur endgültigen Farbentwicklung nach weiteren exakt 45 sec dazu

5 ml 10 n Natronlauge (Reagenz XII).

Röhrchen aus dem Eisbad nehmen, umschütteln, bis sämtliche Luftbläschen verschwunden sind.

Photometrieren: d = 2 cm, 509 nm Cd (Cadmiumlampe).

Zur Herstellung des Blindwertes in das Reagenzglas anstelle der Untersuchungslösung 1 ml aqua bidest geben. Sonst wie mit der Probe verfahren.

Abb. 10 zeigt eine Standardkurve nach diesem Verfahren.

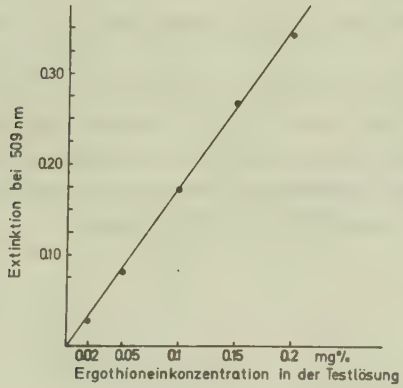


Abb. 10

Berechnung des Ergothioneingehalts im Blut

Der Ergothioneingehalt einer Blutprobe wurde auf
100 ml gepackte Erythrozyten und auf
10^{11} Erythrozyten bezogen.
Er wird nach folgenden Formeln bestimmt:

a) ERGOTHIONEINGEHALT in mg / 100 ml GEPACKTE ERYTHROZYTEN
(auf Hämatokrit = 100 % bezogen)

$$E \times 0{,}5 \times 100 \times \frac{100}{\text{Hämatokritwert}}$$

b) ERGOTHIONEINGEHALT in mg / 10^{11} ERYTHROZYTEN

$$\frac{E \times 0{,}5 \times 100}{\text{Erythrozyten in Millionen pro mm}^3}$$

Dabei entspricht:

E der Extinktionsdifferenz zwischen der Probe und dem Blindwert,

0,5 einem Faktor, der aus dem Standardansatz ermittelt ist. Er stellt den Mittelwert der Quotienten dar, die sich aus den Ergothioneinkonzentrationen der einzelnen Proben und den zugehörigen Extinktionsdifferenzen ergeben.

100 dem Verdünnungsfaktor der Blutprobe.

Rechenbeispiel:

E 0,044
Hkt 63 %
Erythrozyten in Millionen pro mm^3 5,57

a) Ergothioneingehalt in mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten
E x 0,5 x 100 x 100 : Hkt =
0,044 x 0,5 x 100 x 100 : 63 = 3,49

b) Ergothioneingehalt in mg pro 10^{11} Erythrozyten =
E x 0,5 x 100 : Erythrozyten in Millionen pro mm^3 =
0,044 x 0,5 x 100 : 5,57 = 0,39.

8. ERGEBNISSE DER ERGOTHIONEIN- UND GLUTATHIONBESTIMMUNGEN

a) Der Ergothioneingehalt in Erythrozyten verschiedener Altersstufen

Bei der Berechnung des Ergothioneingehalts in mg pro 100 ml Erythrozyten (siehe Abb. 11 und Tab. IV) liegt der niedrigste Wert mit 2,25 in der Neugeborenenperiode vor. Die Ergebnisse für das Frühgeborenen- und Kindesalter entsprechen sich in etwa. Im späteren Lebensalter steigt der Ergothioneinspiegel auf seinen höchsten Wert an, auf 3,80 mg. Mit Ausnahme der Kinder und Frühgeborenen ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant.

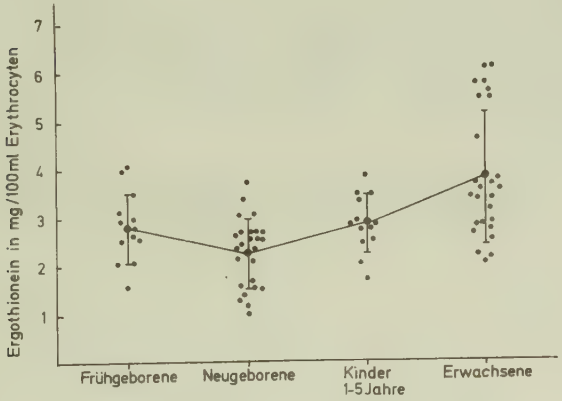


Abb. 11

Wird der Ergothioneingehalt in mg pro 10^{11} Erythrozyten ausgedrückt, so findet man den niedrigsten Wert bei den Kindern (0,25). Auch hier wird im Erwachsenenalter mit 0,39 der höchste Spiegel erreicht. Bei dieser Berechnungsart besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen der Früh- und Neugeborenen einerseits und der Neugeborenen und Kinder andererseits. Alle übrigen Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant (siehe Abb. 12 und Tab. IV).

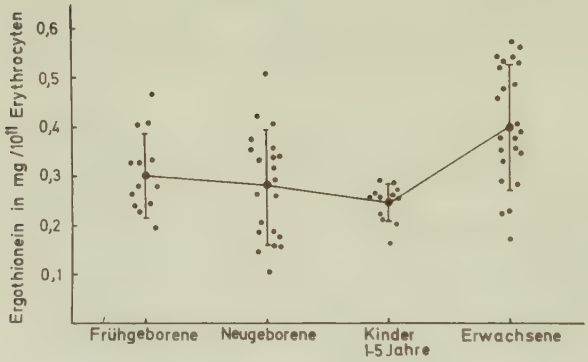
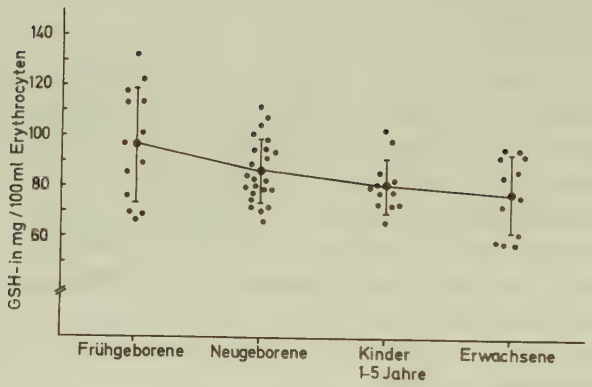


Abb. 12

b) Der Glutathiongehalt in Erythrozyten verschiedener Altersstufen

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen, daß der Glutathiongehalt in den Erythrozyten von Frühgeborenen am höchsten ist, nämlich 96,65 mg% bzw. 10,61 mg pro 10^{11} Erythrozyten (siehe auch Tab. V). Im Laufe des Lebens nimmt er auf 78,14 mg% oder 7,6 mg pro 10^{11} Erythrozyten ab, -kontinuierlich, wenn man die erste Berechnungsart zugrundelegt, aber mit einem starken Abfall vom Neugeborenen- zum Kleinkindesalter und einem leichten Wiederanstieg zu den Erwachsenen hin, wenn man ihn auf die Erythrozytenzahl bezieht.
In der ersten Berechnungsart findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Frühgeborenen und Kindern, den Frühgeborenen und Erwachsenen und den Neugeborenen und Erwachsenen. Auf 10^{11} Erythrozyten bezogen, unterscheiden sich die Frühgeborenen von den Neugeborenen wie auch die Kinder von den Erwachsenen nicht signifikant, die anderen Vergleiche zeigen signifikante Unterschiede.


GSH-in mg / 100 ml Erythrocyten
140
120
100
80
60
Frühgeborene
Neugeborene
Kinder 1-5 Jahre
Erwachsene

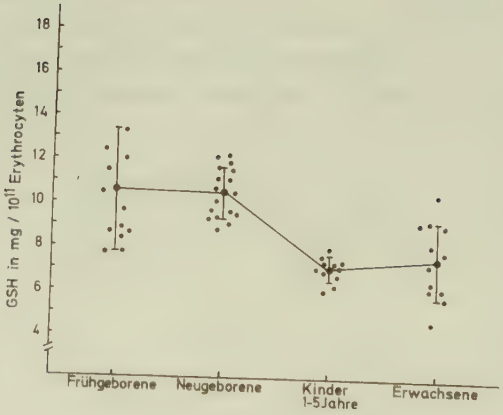

GSH in mg / 10^{11} Erythrocyten
18
16
14
12
10
8
6
4
Frühgeborene
Neugeborene
Kinder 1-5 Jahre
Erwachsene

Abb. 13 u. 14

c) Der Anteil des Ergothioneins an der Gesamtheit der SH-gruppenhaltigen Substanzen

Der prozentuale Anteil des Ergothioneins an den gesamten SH-gruppenhaltigen Substanzen, repräsentiert durch das Glutathion, ist, wie Abb. 15 und Tab. VI (Anhang) zeigen, im Erwachsenenalter mit 6 % am höchsten. Bei Kindern und Neugeborenen ist der Anteil, entsprechend dem höheren Glutathiongehalt in diesen Altersstufen, niedriger (Kinder: 3,5 %, Neugeborene: 2,6 %), bei Frühgeborenen finden wir etwas höhere Werte als bei Neugeborenen, nämlich 3 %. Der statistische Unterschied zwischen den Frühgeborenen und Neugeborenen bzw. den Frühgeborenen und Kindern erweist sich als nicht signifikant, die übrigen Gruppen zeigen signifikante Unterschiede.

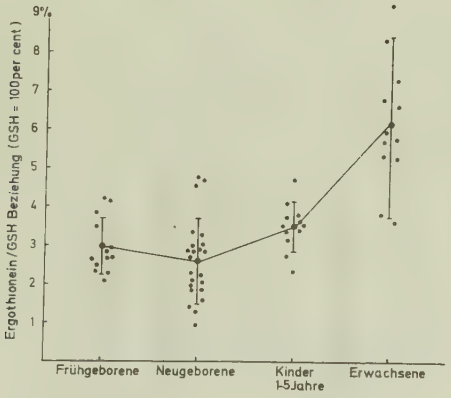
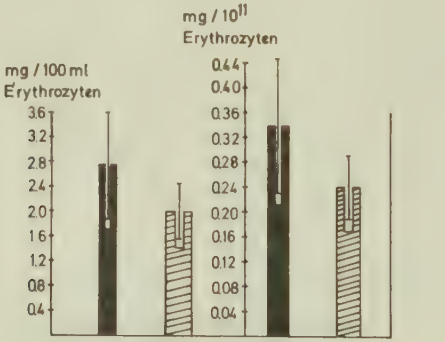


Abb. 15

d) Der Ergothioneingehalt in retikulozytenreichen und retikulozytenarmen Erythrozytenpopulationen

An 11 Proben von Neugeborenenblut wurde eine Trennung in retikulozytenreiche und -arme Erythrozytenfraktionen durchgeführt. In beiden Fraktionen wurde der Ergothioneingehalt ermittelt, wie immer in Doppelproben, aus deren Ergebnissen der Mittelwert gebildet wurde.
Die Ergebnisse sind, zusammen mit dem Gehalt an Erythrozyten und Retikulozyten, in Abb. 16 und Tab. VI (Anhang) wiedergegeben. Der Vergleich des Ergothioneingehalts in jungen, retikulozytenreichen und alten, retikulozytenarmen Erythrozytenpopulationen zeigt, daß die erstgenannten einen höheren Gehalt an Ergothionein besitzen. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Menge der Substanz auf 10^{11} Erythrozyten bezieht, die retikulozytenreiche Fraktion enthält 0,32 mg Ergothionein gegenüber 0,24 mg in der retikulozytenarmen Schicht.



Ergothioneingehalt in retikulozytenreichen und -armen Erythrozytenpopulationen

Abb. 16

e) Das Verhalten des Ergothioneinspiegels in alterndem Blut

Um festzustellen, ob der Ergothioneingehalt in verschieden alten Blutproben gleich hoch ist oder sich verändert, wurden über einen Zeitraum von 16 Tagen Bestimmungen an drei Blutkonserven durchgeführt. Die Konserven wurden bei +4°C aufbewahrt, das Blut jeweils unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 wiedergegeben (siehe auch Tab. V).
Es ist deutlich zu erkennen, daß der Ergothioneingehalt mit zunehmendem Alter des Blutes abnimmt. Der Abfall ist gleichmäßig und beträgt pro Tag zwischen 0,15 und 0,19 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten.

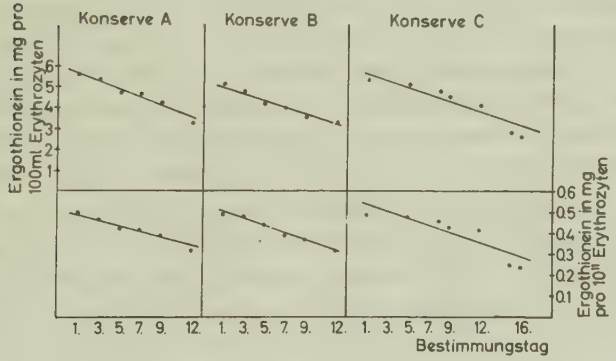


Abb. 17

9. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Bestimmung des Ergothioneins, dem Betainderivat des Thiolhistidins, unternommen. Diese Substanz kommt unter anderem in den Erythrozyten vor und enthält eine Sulfhydrilgruppe, deren Aufgabe es sein könnte, in den Blutkörperchen eine Schutzfunktion auszuüben. - Die Bestimmung des Ergothioneins ist relativ schwierig. So ist es zu verstehen, daß in der Literatur stark voneinander abweichende Ergebnisse zu finden sind (s. Tab. I). Alle Methoden arbeiten mit Reagentien, die nicht für Ergothionein spezifisch sind. Die Elimination von Substanzen aus dem Untersuchungsmaterial, die ebenfalls reagieren könnten, ist deshalb entscheidend. Diese Forderung wird durch keine der bisher beschriebenen Methoden ganz erfüllt.

Wir versuchten zunächst, eine neue Methode zur Ergothioneinbestimmung zu entwickeln. In Anlehnung an die Glutathionbestimmung von BEUTLER (1963) wurde Ergothionein mit DTNB, einem für Sulfhydrilgruppen spezifischen Reagenz, angefärbt. BEUTLER selbst gibt an, daß mit DTNB nicht nur das reduzierte Glutathion, sondern sämtliche sulfhydrilgruppenhaltigen Substanzen, darunter auch das Ergothionein, erfaßt werden. Eine reine Ergothioneinlösung bildete mit DTNB den erwarteten Farbstoff. Ein Blutextrakt, aus dem die anderen, mit DTNB reagierenden Substanzen eliminiert waren, führte dagegen nicht zur Farbstoffbildung. Auch durch Lyophilisierung ließ sich keine Anreicherung des Ergothioneins erzielen. Bei vielfältigen Variationen der einzelnen Reaktionspartner und der Wasserstoffionenkonzentration stellten wir fest, daß die Bildung des Farbstoffs nicht nur vom Ergothioneingehalt des Blutextraktes abhängt. Standardisierbare

Bedingungen für eine Ergothioneinbestimmung mit DTNB waren nicht herauszuarbeiten.

Es wurden daher Versuche zur Diazofärbung nach HUNTER (1949) und ihrer Modifikation nach MELVILLE (1952) durchgeführt. Um sicher alle die Färbung beeinträchtigenden Substanzen aus der Untersuchungslösung zu entfernen, wurde der Blutextrakt nach MELVILLE mit Chloroform und zwei verschiedenen Ionenaustauschern behandelt. Parallelbestimmungen an verschieden bearbeiteten Proben sowie Aminosäureanalysen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten ergaben, daß dieser methodische Mehraufwand nicht notwendig ist, um exakte Ergebnisse zu erhalten.

Eine die Diazofärbung besonders beeinträchtigende Substanz ist das Glutathion (HUNTER, 1949, MELVILLE, 1952). Seine Entfernung ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine einwandfreie Ergothioneinbestimmung. Goulard's Extrakt, der zur Entfernung des Glutathions am besten geeignet ist, läßt sich nur unter Schwierigkeiten herstellen. Offenbar kommt es durch den hohen Bleigehalt unter der Einwirkung des Luftsauerstoffs leicht zur Bildung von Bleioxyd, das ausfällt und damit nicht mehr reaktionsfähig ist. Dies verhinderten wir, indem wir das Reagenz unter Luftabschluß herstellten und schnell mit Unterdruck filtrierten.

Vor der Diazofärbung wird dem Blutextrakt ein Alkalipuffer zugesetzt. Die Kombination von Natriumazetat und Natriumbikarbonat hat sich hier als günstig erwiesen. Nach KOESSLER und HANKE (1919) kommt es bei Verwendung von reinem Natriumazetat nicht zur Farbstoffbildung, von reinem Natriumbikarbonat nur, wenn dieses in großem Überschuss vorhanden ist; Ammoniumhydroxid reagiere mit diazotierter Schwefelsäure allein unter Bildung eines grünen Farbstoffes, mit Natriumhydroxid werde nur eine blasse, labile Farbe erzeugt.

HUNTER gibt an, daß für die Diazofärbung exakte Reaktionszeiten wichtig sind. Im ersten Schritt dieser Färbung wird das Ergothionein mit dem Natriumsalz der diazotierten Sulfanilsäure gekoppelt,und es entsteht ein gelber, unstabiler Farbstoff. Der stabile rote Farbstoff wird durch Zugabe einer starken Base gebildet. Diese darf erst zugesetzt werden, wenn die beschriebene Kupplung vollzogen ist, andererseits darf das Kupplungsprodukt noch nicht durch den Alkalipuffer abgebaut sein. HUNTER schreibt eine Reaktionszeit von 45 Sekunden vor. Darüberhinaus haben wir festgestellt, daß auch die Zeit, während der das Diazoniumsalz mit dem Alkalipuffer reagiert, von Bedeutung ist. Wir konnten zeigen, daß das Diazoniumsalz umso weniger mit dem Ergothionein reagiert, je länger die Reaktion mit dem Alkalipuffer vor Zugabe des Blutextraktes währte. Offensichtlich tritt ein Abbau des Diazoniumsalzes ein, der nur durch standardisierte Reaktionszeiten berechenbar wird. Somit haben wir festgesetzt, genau 30 Sekunden nach Zugabe von Diazoniumsalz und Alkalipuffer die Testlösung zuzusetzen.

Unsere anschließenden Bestimmungen wurden grundsätzlich in Nüchternblut durchgeführt. So konnten die von uns festgestellten Einflüsse durch die Nahrungsaufnahme oder kurz vorher gegebene Medikamente ausgeschaltet werden.

Ferner konnten wir zeigen, daß nur die Bestimmung in gewaschenen Erythrozyten sinnvoll ist. Durch die Eliminierung des Plasmas und das Waschen der roten Blutkörperchen werden Substanzen ausgeschaltet, die eine "Ergothioneinanfärbung" vortäuschen und damit die Bestimmungsergebnisse verfälschen, wie z.B. die im Plasma vorhandenen Aminosäuren Tyrosin und Histidin, die durch das Diazoreagenz angefärbt werden. Andererseits konnten wir nachweisen, daß durch den Waschvorgang kein Verlust an Ergothionein eintritt.

Systematische Ergothioneinbestimmungen im Verlaufe der gesamten Kindheit bis zum Erwachsenenalter sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Bei den Untersuchungen in verschiedenen Lebensaltern stellten wir fest, daß im Erwachsenenalter die höchsten Ergothioneinspiegel erreicht werden. Bezogen auf 100 ml Erythrozyten, besitzen die Neugeborenen knapp 60 % dieses Wertes, im Kleinkindesalter steigt der Gehalt auf 75 % an. Die Ergebnisse der Frühgeborenen entsprechen ungefähr den Werten im Kindesalter. Bei dem niedrigen Wert in der Neugeborenenperiode ist das große Einzelzellvolumen der Erythrozyten zu berücksichtigen. Dadurch finden sich in einem bestimmten Gesamtvolumen eine kleinere Anzahl an Einzelerythrozyten. Auf 10^{11} Erythrozyten berechnet, finden sich bei den Frühgeborenen knapp 80 % des Erwachsenengehaltes. Dieser Wert fällt über 70 % im Neugeborenenalter auf 64% bei den Kleinkindern ab. Hier macht sich die physiologische Mikrozytose bemerkbar.

Unsere Ergebnisse liegen sehr viel niedriger als die der meisten anderen Autoren (s. Tab. I, Anhang). Dies beruht z.T. auf dem gründlichen Waschvorgang, den zumindestens HUNTER, BEHRE und BENEDICT und auch LATNER nicht vollziehen, ferner sicherlich auch auf der Bestimmung in Nüchternblut. MELVILLE und auch SAWINIEC beschreiben Ergebnisse, die mit unseren vergleichbar sind. Beide Autoren waschen die Erythrozyten vor der Bestimmung. Die mehrfachen Reinigungsschritte, die in ihren Methoden angewandt werden, haben sich nach unseren Untersuchungen als überflüssig erwiesen.

Parallel zu den Ergothioneinbestimmungen wurde in den Erythrozyten der Gehalt an Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen, repräsentiert durch das Glutathion, ermittelt. Wir bedienten uns dazu der Methode von BEUTLER(1963).

Die höchsten Werte finden sich im Frühgeborenenalter, danach nimmt der GSH-Gehalt im Laufe des Lebens ab. Wählt man als Bezugswert 100 ml gepackte Erythrozyten, so ist dieser Abfall kontinuierlich über 90 % im Neugeborenen- und 84 % im Kindesalter auf ungefähr 80 % bei den Erwachsenen. Berechnet man den GSH-Gehalt auf 10^{11} Erythrozyten, dann sind in der Neugeborenenperiode noch 99 % des Frühgeborenenwertes vorhanden. Im Kindesalter ergibt sich mit 67 % der niedrigste Spiegel, bei den Erwachsenen fanden wir im Mittel 72 % des Frühgeborenenwertes. Für den ungleichmäßigen Abfall ist auch hier das kleine Erythrozytenvolumen im Kleinkindesalter verantwortlich.
Bei der Berechnung des Anteils des Ergothioneins an der Gesamtheit der Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen ergab sich, daß dieser niedriger als bisher angenommen ist. Nach den HUNTERschen Ergebnissen würde er bis zu 10 % betragen. Unsere Werte steigen mit dem Lebensalter kontinuierlich auf maximal 6 % an. Der Anstieg entspricht dem gering zunehmenden Ergothioneingehalt bei deutlich fallendem GSH-Spiegel.

Aus den altersabhängigen Unterschieden ergab sich auch die Frage, ob der Ergothioneingehalt von der Retikulozytenzahl beeinflußt wird. Daher wurde ein Vergleich des Ergothioneingehalts in jungen, retikulozytenreichen und alten, retikulozytenarmen Erythrozytenpopulationen angestellt. Bei der Berechnung auf 100 ml Erythrozytensuspension waren in der retikulozytenarmen Fraktion nur 76 % des Ergothioneingehalts der retikulozytenreichen Probe enthalten, bezogen auf 10^{11} Erythrozyten 75 %. Somit scheinen die Retikulozyten etwas vermehrt Ergothionein zu enthalten. Gestützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß der Ergothioneingehalt des Blutes mit zunehmendem Alter desselben kontinuierlich abnimmt. Dies bewiesen über 16 Tage-

durchgeführte Verlaufskontrollen an drei Frischblutkonserven. Nach einer Woche fanden wir ungefähr noch 80 %, nach 12 Tagen 66 %, nach 16 Tagen dann nur noch 50 % des Ausgangswertes. Der Ergothioneingehalt, der in den ersten Tagen im Konservenblut bestimmt wurde, war relativ hoch. Er lag an der oberen Normgrenze. Das Blut stammte von Routinespendern. Auch FRASER (1951) fand bei diesen Personen einen erhöhten Ergothioneinspiegel. Nach den oben beschriebenen Untersuchungen an retikulozytenreichem Blut könnte bei den Blutspendern eine Retikulozytenvermehrung für den hohen Ergothioneinwert verantwortlich sein.

Der Ergothioneingehalt der roten Blutkörperchen steigt nach unseren Ergebnissen während des Lebens an, während sich der Glutathiongehalt gegensätzlich verhält. Damit steigt der Anteil des Ergothioneins an der Gesamtheit der Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen. Da mit der BEUTLERschen Methode nur die Höhe des reduzierten Glutathion gemessen wird, ist nicht zu entscheiden, ob das Glutathion abnimmt oder nur in zunehmendem Maße oxydiert wird. Bei der Ergothioneinbestimmung erfassen wir die reduzierte und die oxydierte Form.

Wenn Ergothionein eine Rolle im Schutzmechanismus der Erythrozyten spielt, dann erhebt sich die Frage, ob es im Laufe des Lebens im Sinne einer Induktion durch oxydierende Substanzen vermehrt produziert wird. Es könnte bei einem sinkenden Glutathiongehalt im höheren Alter von zunehmender Wichtigkeit sein, diesem gewissermaßen als Reserve nachgeschaltet. Allerdings ist noch kein Enzym bekannt, das das Ergothionein in den Erythrozyten synthetisiert. Die Synthese könnte erfolgen, solange die roten Blutkörperchen noch kernhaltig sind. Hierzu paßt der von

uns festgestellte vermehrte Ergothioneingehalt in retikulozytenreichen Erythrozytenpopulationen, ferner auch die Abnahme der Substanz in alterndem Blut.

Der endgültige Beweis, daß Ergothionein ähnliche Aufgaben wie das Glutathion erfüllt, steht noch aus. Vielleicht bildet seine SH-Gruppe den letzten Schutz gegen oxydative Noxen, wenn die Glutathionreserven erschöpft sind.

10. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Ergothioneinbestimmung durchgeführt. Es wurde der Gehalt in Erythrozyten der verschiedenen Lebensalter, in retikulozytenreichen und -armen Fraktionen und in alterndem Konservenblut festgestellt. Parallel zu den Bestimmungen in verschiedenen Lebensaltern wurde der Glutathiongehalt ermittelt und das Verhältnis der beiden Substanzen zueinander bestimmt.

1. Im Rahmen der methodischen Versuche wurde zunächst die Anfärbung mit DTNB erprobt. Nach vielfältigen Variationen erwies sich dieses Reagenz als nicht geeignet.

2. Die Bestimmungen wurden mit Hilfe der Diazofärbung nach HUNTER vorgenommen. Als Verbesserungen wurden eingeführt:
a) Die Verwendung von Nüchternblut.
b) Dreimaliges Waschen der Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung.
c) Standardisierte Reaktionszeiten bei der Diazofärbung.

3. Parallel zu den Ergothioneinbestimmungen wurde der Gesamtgehalt an Substanzen mit wasserlöslichen SH-Gruppen ermittelt und der Anteil des Ergothioneins an dieser Substanzengruppe errechnet.
Sämtliche Ergebnisse wurden in mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten und in mg pro 10^{11} Erythrozyten ausgedrückt.

4. Die Bestimmungen wurden an 13 Frühgeborenen, 25 Neugeborenen, 12 Kindern und 27 Erwachsenen durchgeführt.

5. Der Ergothioneinspiegel liegt
bei den Frühgeborenen bei 2,82 $\pm$ 0,73 mg/100 ml gepackte Erythrozyten bzw. bei 0,31 $\pm$ 0,09 mg pro 10^{11} Erythrozyten.

Im Neugeborenenalter ist er etwas erniedrigt (2,25 ± 0,72 bzw. 0,28 ± 0,12), um
im Erwachsenenalter auf einen Höchstwert von 3,80 ± 1,37 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,39 ± 0,13 mg pro 10^{11} Erythrozyten anzusteigen.

6. Der Glutathiongehalt beträgt
bei Frühgeborenen 96,65 ± 22,63 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 10,61 ± 2, 88 mg pro 10^{11} Einzelerythrozyten.
Er fällt dann über
86,33 ± 12,84 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten bzw. 10,55 ± 2,97 mg / 10^{11} Erythrozyten bei den Neugeborenen und 81,01 ± 10,69 mg / 100 ml gepackte Erythrozyten oder 7,12 ± 0,57 mg pro 10^{11} Erythrozyten bei den Kindern auf einen Erwachsenenwert von 78,14 ± 15,36 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten bzw. 7,60 ± 1,73 mg 10^{11} Erythrozyten ab.

7. Hieraus ergibt sich der Anteil des Ergothioneins an der Gesamtheit der Substanzen mit wasserlöslichen Sulfhydrilgruppen:
Er steigt von 2,97 ± 0,72 % bei den Frühgeborenen
über 3,48 ± 0,64 % im Kindesalter
auf 6,12 ± 0,24 % im Erwachsenenalter an.
Der Neugeborenenwert ist mit 2,60 ± 1,1 % etwas niedriger als der der Frühgeborenen.

8. Der Ergothioneingehalt liegt in
retikulozytenreichen Erythrozytenpopulationen mit 2,75 ± 0,89 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,32 ± 0,11 mg pro 10^{11} Erythrozyten höher als in
retikulozytenarmen Vergleichsproben. Hier wurde ein mittlerer Wert von 2,0 ± 0,45 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,24 ± 0,05 mg / 10^{11} Erythrozyten gefunden.

9. Bei fortlaufenden Kontrollen des Ergothioneingehaltes in alterndem Konservenblut (3 Konserven) wurde ein Abfall beobachtet. In einer Bestimmungsserie betrug er innerhalb von 16 Tagen 2,67 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,24 mg pro 10^{11} Erythrozyten (von 5,35 bzw. 0,49 auf 2,68 bzw. 0,24).
In der zweiten Konserve fiel der Ergothioneinspiegel innerhalb von 12 Tagen um 2,29 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,18 mg pro 10^{11} Einzelerythrozyten ab (1.Tag 5,60 bzw. 0,50, 12.Tag 3,31 bzw. 0,32).
Im dritten Fall wurde ein Abfall von 1,77 mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten oder 0,17 mg pro 10^{11} Erythrozyten ermittelt (von 5,15 oder 0,49 auf 3,38 oder 0,32).

10. Die dem Glutathion ähnliche Konstitution des Ergothionein läßt die Vermutung zu, daß auch diese Substanz eine Schutzfunktion für die Erythrozyten hat. Im Gegensatz zum Glutathion steigt der Ergothioneinspiegel im Laufe des Lebens an. Da wir in den Retikulozyten erhöhte Werte feststellen konnten, vermuten wir, daß die Synthese des Ergothioneins in der kernhaltigen Phase der Erythrozyten erfolgt. Das synthetisierende Enzym ist allerdings noch nicht bekannt.

LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMANN,D., P.LIST und H.G.MENSSEN: Über das Vorkommen von Hercynin neben Ergothionein in der Samenflüssigkeit des Ebers sowie in Rindererythrozyten und die biologische Beziehung der beiden Basen zueinander.
Z.Physiol.Chem. 314: 33-37 (1959)

ASKARI,A. und D.B.MELVILLE: The Reaction Sequence in Ergothioneine Biosynthesis: Hercynine as an Intermediate.
J.Biol.Chem. 237: 1615-1618 (1962)

BEHRE,J.A. und S.R.BENEDICT.
J.Biol.Chem. 82,11 (1929)

BENEDICT,S.R., E.B.NEWTON und J.A.BEHRE.
J.Biol.Chem. 67,267(1926)

BEUTLER,E., O.DURON und B.M.KELLY: Improved method for the determination of blood glutathione.
J.Lab. and Clin.Med. 61: 882 (1963)

BOOTH,J.S. and M.D.APPLEMAN: Degredation of Ergothionein by cellfree extracts of Alcaligenes faecalis.
J.Bacteriol. 85: 654-657 (1963)

BUSCH,D. und A.PELZ: Erythrozytenisolierung aus Blut mit Baumwolle.
Klin.Wchschr. 46: 983 (1966)

EAGLES,B.A. and T.B.JOHNSON: The Biochemistry of sulfur. 1. The identity of ergothioneine from ergot of rye with sympectothion and thiasin from pigs blood.
J.Am.Chem.Soc. 49: 575 (1927)

FRASER,R.S.: Blood Ergothioneine Levels in Diabetes mellitus.
J.Lab.Clin.Med. 35: 960 (1950)

FRASER,R.S.: Ergothioneine Levels in Disease.
J.Lab. and Clin.Med. 37: 199-206 (1951)

GENGHOF,D.S. and O.van DAMME: Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Mycobacteria. J.Bacteriol.87: 852-862 (1964)

GOULARD's Extrakt: United States Pharmacopeia IX Philadelphia 1916, 249.

HEATH,H. and G.TOENNIES: The Preparation and Properties of Ergothionein Disulphide. Biochem.J. 68: 204 (1958)

HUNTER,G. and B.A.EAGLES: Non Protein Sulfur Compounds of Blood. 1. Sympectothion 2. Glutathion J.Biol.Chem. 72: 123,133 (1927)

HUNTER,G.: A new test for Ergothioneine upon which is based a method for its Estimation in simple solutions and in blood filtrates. Biochem.J. 22: 4 (1928)

HUNTER,G.: The Determination of Ergothioneine in Simple Solutions and in Blood. Canad.J.Res. 27: 230-239 (1949)

KELLY,B. and M.D.APPLEMAN: Degredation of Ergothioneine by cellfree extracts of Alkaligenes faecalis. J.Bacteriol. 81: 715-720 (1961)

KLEBANOFF,S.J.: An Interrelatioship between Ergothioneine certain Phenolic Hormones and Peroxidase. Biochem.Biophys Acta. 56: 460-469 (1962)

KOESSLER,K.K. and M.T.HANKE: A microchemical colorimetric method for estimating imidazol derivates. J.Biol.Chem. 39: 497 (1919)

LATNER,A.L.: A colorimetric method for the Estimation of Ergothioneine in Human Blood. - Blood Ergothioneine Values in Normal Individuals and Thyreotoxikosis. Biochem.J. 42: 35 (1948)

LAWSON,A. and C.RIMINGTON: Antithyreoid Activities of Ergothioneine, a Normal Constituent of Blood. Lancet 1: 586 (1947)

LINNEWEH,F., W.BARTHELMAI und G.WENSKE: Über Erfahrungen mit der vollautomatischen Aminosäureanalyse im Ultra-Mikrobereich.
Klin.Wschr. 47: 971-975 (1969)

MELVILLE,D.B. and R.LUBSCHEZ: A Method for the Determination of Ergothioneine in Blood.
J.Biol.Chem. 200: 275-285 (1952)

NEWTON,E.B.,S.R.BENEDICT and H.D.DAKIN: On Thiasine, its structure and identification with Ergothioneine.
J.Biol.Chem. 72: 367-373 (1927)

OSKI,F.A. and J.L.NAIMAN: Hematologic Problems in the Newborn.
W.B.Saunders Co, Philadelphia and London
S. 95-97 (1972)

RACKER,E.: Glutathione Reductase Liver and Yeast. Methods in Encymology 2.
Page 722, edit Colowick,S.P. and Kaplan,N.O., New York, Acad.Press (1965)

RIETKÖTTER,J.: Inaugural-Dissertation, Marburg 1970
Entwicklung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität in jungen und alten Erythrozyten vom Foetal- bis zum Erwachsenenalter.

SALT,H.B.: Ergothioneine Content of Blood in Health and Disease.
Biochem.J. 25: 1712 (1931)

SAWINIEC,Z. and T.Szumilo: Determination of Ergothioneine in Luman erythrozytes.
Pol.Tygod.Lek. 22 (34) 1293-5 (1967)

TANRET,M.C.: Sur une base nouvelle retire du seigle ergot l'ergothionein.
Compt.Rend. 49: 222-224 (1917)

TOUSTER,O.: Estimation of Blood Ergothioneine by Determination of Bromine-Labile Sulfur.
J.Biol.Chem. 188: 371-377 (1951)

WITT, Irene, M.HERDAM und W.KÜNZER: Vergleichende Untersuchungen von Enzymaktivitäten in retikulozytenreichen und retikulozytenarmen Fraktionen aus Neugeborenen- und Erwachsenenblut.
Kl.Wschr. 46 Heft 3, S. 149

WOLF,G., J.G.BERGAN and D.E.SUNKO: Metabokism studies with DL (a-^{14}C) Ergothioneine.
Biochim.Biophys.Acta 54: 287 - 293 (1961)

WOLFF,J.B.: Ergothionase from Escherichia Coli.
J.Biol.Chem. 237: 874 - 881 (1962)

YANASUGONDHA,D. and M.D.APPLEMAN: Degredation of Ergothioneine by Alcaligenes faecalis.
J.Bacteriol.74: 381 - 385 (1957)

ANHANG

Tab. I ERGOTHIONEINWERTE EINZELNER AUTOREN

Autor	Jahr	Ergothionein in mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten	
BEHRE und BENEDICT	1929	4,2 - 15,0	(Vollblut)
HUNTER	1949	10,5 - 15,6	
FRASER	1950	9,6	
LATNER	1948	5,0 - 14,1	
MELVILLE	1952	1,5 - 4,2	
TOUSTER	1951	7,3	
SAWINIEC und SZUMILO	1967	3,7 4,2	(Frauen) (Männer)

Tab. II AMINOSÄUREANALYSEN

	Gehalt an Aminosäuren in 10^{-9} Mol/ml Extrakt		
	I	II	III
Asparaginsäure	1,33	2,00	2,00
Threonin	4,66	3,33	4,00
Serin Asparagin	40,63	38,63	39,29
Prolin	9,32	7,33	7,35
Glutaminsäure	8,66	5,99	4,66
Glykokoll	24,64	25,31	19,98
Alanin	21,98	16,65	18,65
Cystin	1,33	1,33	1,32
Valin	5,99	5,99	5,98
Methionin	1,35	1,33	1,38
Isoleucin	4,00	2,66	2,82
Leucin	3,33	3,33	3,33
Tyrosin	4,00	4,00	4,00
Phenylalanin	1,33	2,00	1,78

I unbehandelter Extrakt

II Extrakt nach Behandlung mit Chloroform und CM 23-Cellulose

III Extrakt nach Behandlung mit Chloroform und DE 52-Cellulose

Tab. III VERGLEICH DES ERGOTHIONEIN- UND GESAMT-SH-GEHALTES IN VOLLBLUT, PLASMA UND ERYTHROZYTEN-SUSPENSION

	n	Ergothionein in mg pro 100 ml	Gesamt-SH Erythrozyten-suspension
Vollblut	3	5,29 ± 1,22	63,1 ± 9,6
Plasma	3	1,98 ± 0,41	0,15± 0,02
Erythrozyten, ungewaschen	3	4,24 ± 0,93	65,4 ± 9,85
Erythrozyten, gewaschen	3	2,78 ± 0,44	65,9 ±10,13
Überstand nach Waschvorgang	2	nicht meßbar	nicht meßbar

Tab. IV ERGOTHIONEINGEHALT IN ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENER ALTERSSTUFEN

Altersgruppe	n	Ergothionein in mg pro 100 ml gepackte Erythrozyten	Ergothionein in mg pro 10^{11} Erythrozyten
a) Frühgeborene	13	2,82 ± 0,73	0,31 ± 0,09
b) Neugeborene	25	2,25 ± 0,72	0,28 ± 0,12
c) Kinder 1-5 Jahre	12	2,86 ± 0,61	0,25 ± 0,61
d) Erwachsene	27	3,80 ± 1,37	0,39 ± 0,13

Statistische Berechnung:

a vs b $p < 0,05$	a vs b $p > 0,05$
a vs c $p > 0,05$	a vs c $p < 0,05$
a vs d $p < 0,05$	a vs d $p < 0,05$
b vs c $p < 0,05$	b vs c $p > 0,05$
b vs d $p < 0,05$	b vs d $p < 0,05$
c vs d $p < 0,05$	c vs d $p < 0,05$

Tab. V GLUTATHIONGEHALT IN ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENER ALTERSSTUFEN

Altersgruppe	n	Glutathion mg pro 100 ml gep. Erythrozyten	Glutathion mg pro 10^{11}
a) Frühgeborene	13	96,65 ± 22,63	10,61± 2,88
b) Neugeborene	21	86,33 ± 12,84	10,55± 2,97
c) Kinder 1 - 5 Jahre	11	81,01 ± 10,69	7,12± 0,57
d) Erwachsene	12	78,14 ± 15,36	7,60± 1,73

Statistische Berechnung:

a vs b p > 0,05	a vs b p > 0,05
a vs c p < 0,05	a vs c p < 0,05
a vs d p < 0,05	a vs d p < 0,05
b vs c p > 0,05	b vs c p < 0,05
b vs d p < 0,05	b vs d p < 0,05
c vs d p > 0,05	c vs d p > 0,05

Tab. VI ERGOTHIONEINANTEIL AN DER GESAMTHEIT DER SULFHYDRILGRUPPENHALTIGEN SUBSTANZEN

Altersgruppe	n	Ergothioneingehalt in ‰	Statistische Berechnung
a) Frühgeborene	13	2,97 ± 0,72	a vs b $p > 0,05$
			a vs c $p > 0,05$
b) Neugeborene	21	2,60 ± 1,1	a vs d $p < 0,05$
c) Kinder 1 - 5 Jahre	11	3,48 ± 0,64	b vs c $p < 0,05$
			b vs d $p < 0,05$
d) Erwachsene	12	6,12 ± 0,24	c vs d $p < 0,05$

Tab. VII ERGOTHIONEINGEHALT IN RETIKULOZYTENREICHEN UND -ARMEN ERYTHROZYTENPOPULATIONEN

	n	Retikulozyten in %	Ergothionein in mg pro 100 ml	Ergothionein in mg pro 10^{11} Erythrozyten
Fraktion I	11	40 ± 2,47	2,75 ± 0,89	0,32 ± 0,11
Fraktion II	11	17 ± 3,8	2,00 ± 0,45	0,24 ± 0,05

Fraktion I = retikulozytenreiche Fraktion
Fraktion II = retikulozytenarme Fraktion

Tab. VIII ERGOTHIONEINGEHALT IN ALTERNDEM BLUT

Bestimmungs-tag	Konserve A		Konserve B		Konserve C	
	Ergothioneingehalt in mg pro					
	100ml	10^{11} Erythrozyten	100ml	10^{11} Erythrozyten	100ml	10^{11} Erythrozyten
1.	5,60	0,50	5,15	0,49	5,35	0,49
3.	5,35	0,46	4,82	0,48		
5.	4,74	0,42	4,20	0,44	5,18	0,48
7.	4,70	0,42	4,03	0,39		
8.					4,83	0,46
9.	4,30	0,39	3,61	0,37	4,58	0,43
12.	3,31	0,32	3,38	0,32	4,15	0,42
15.					2,86	0,25
16.					2,68	0,24

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Leitung dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr.med.W.Barthelmai meinen Dank aussprechen.

Ich danke Herrn Professor Dr.med.F.Linneweh für die großzügige Unterstützung, die mir im Forschungslabor seiner Klinik zuteil wurde.

Für seine Hilfe und Anregungen danke ich Herrn Dr.med. M.Vetrella.

Frau Medizinalassistentin Brigitte Krommes, die eine Parallelarbeit verfaßte, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 2. März 1947 wurde ich in Hannover als Tochter des Arztes Dr. Heinrich Lachmund und seiner Ehefrau Susanne, geb. Pfeiffer, geboren. Von Ostern 1953 an besuchte ich die Volksschule Kestnerstraße Hannover, ab Ostern 1957 war ich Schülerin der Sophienschule Hannover, einem alt- und neusprachlichen Gymnasium für Mädchen. Hier legte ich Ostern 1966 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1966 nahm ich an der Philipps-Universität Marburg das Medizinstudium auf. Am 13.3.1967 bestand ich in Marburg die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 23. 9. 1968 die Ärztliche Vorprüfung. Im Wintersemester 1968/69 sowie im Sommersemester 1969 studierte ich an der 2. Medizinischen Fakultät München. Zum Wintersemester 1969/70 kehrte ich nach Marburg zurück, wo ich am 2. 12. 1971 die Ärztliche Prüfung ablegte. Am 1.4. 1972 begann ich in der Universitätshautklinik meine Medizinalassistentenzeit. Seit dem 1.6.1972 bin ich Medizinalassistentin im Diakoniekrankenhaus Wehrda.
Seit dem 5. 2. 1972 bin ich mit dem Medizinalassistenten Dr.med.Carl-Peter Fues verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg:

Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Ehrhardt, Exner, Ganz, Hamm, Hardewig, Hensel, Hildebrandt, Hort, Karlson, Lang, Linneweh, Lübbers, Lütcke, Mahr, Mann, Martini, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Milbradt, Oehmig, Petry, Pots, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel,F., Seidel,W., Siegert, Siess, Solcher, Spiegelberg, v. Stosch, Straub, Strohmeyer, Vogt, Voss, Walcher,

in München:

Bauer, Blömer, Brachmann, Burkhard, Gössner, Gresser, Hilber, Kressner, Lechner, Ley, Liebermeister, Matussek, Maurer, Merte, Netzer, Reiter, Sewering, Stickl, Struppler.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: "Ergothioneingehalt der Erythrozyten in verschiedenen Altersstufen" in der Universitätskinderklinik Marburg unter Leitung von Herrn Professor Dr.med. W.Barthelmai mit Unterstützung durch Herrn Dr.med.M.Vetrella ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, d. 20.11.1972

DIFO–DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216